

令和元年5月31日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06160

研究課題名（和文）コヒーシンリングによる姉妹染色体接着形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Biochemical characterizations of the cohesin ring for understanding the establishment mechanism of sister chromatid cohesion

研究代表者

村山 泰斗（MURAYAMA, Yasuto）

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：60531663

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,200,000円

研究成果の概要（和文）：コヒーシンが形成する姉妹染色分体間接着は、細胞分裂における正確な染色体分配に必須である。コヒーシンはユニークなDNA結合を介して接着を形成するが、その分子機構については不明な点が多い。本研究は、コヒーシンの生化学的性質を解析し、その動作機構の一端が明らかにした。特に、コヒーシンが多段階の制御を経てDNA分子同士を安定に繋ぎ止める活性があることを見出し、接着形成について新たな分子モデルを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体分配に不可欠であることに加え、コヒーシンは間期染色体のグローバルな高次構造形成も制御し、転写制御を介して分化・発生にも関与することが次々と判明している。また、様々な染色体機能が明らかになる中、その機能異常が染色体異常疾患や不妊等と関連することが報告されている。本研究は、精製コヒーシンのDNA結合活性を直接解析することで動作機構の一端を明らかにした。得られた知見は、基礎研究への貢献に加え、長期的展望として人類の健康増進に資する研究につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Cohesin is a ring-shaped, multisubunit ATPase that topologically encircles DNA. The ring complex makes vital contributions to sister chromatid cohesion and global chromosomal organization to regulate numerous chromosomal events including chromosome segregation, DNA repair and transcriptional regulations. How cohesin establishes these chromosomal structures by topological DNA embrace is poorly understood. Here we found that purified cohesin mediates DNA-DNA interactions by single-stranded DNA (ssDNA)-dependent mechanism. Our genetic analyses have also suggested that ssDNA region plays important roles for establishment of sister chromatid cohesion. This study unveiled a novel cohesin's activity and provides mechanistic insight into establishment of sister chromatid cohesion.

研究分野：分子生物学

キーワード：染色体動態 染色体分配 姉妹染色分体間接着 SMC複合体 コヒーシン 試験管内再構成

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体細胞分裂における染色体の均等分配が遺伝情報の継承の実体であることは、一世紀以上前に提唱されていた。染色体は DNA 複製を経て倍化した後、コヒーシン複合体の働きによって、互いに離れないように接着している。この姉妹染色分体間接着は紡錘体による張力形成の起点となり、染色体の正確な分配方向を規定する。一方で、接着は DNA 二重鎖切断等の重篤な損傷の修復のための構造基盤でもあり、遺伝情報の維持継承に必須の染色体構造の一つである。

コヒーシンはリング構造のタンパク質複合体で、酵母の遺伝学研究から同定された。この複合体はリングの中を通すように DNA と相互作用することが知られ(トポロジカルな DNA 結合)、このユニークな DNA 結合活性を介して倍加した染色体同士を接着すると考えられている [1] (図 1)。コヒーシンはローダー複合体によってクロマチン上にリクルートされ、DNA 複製に伴って接着を形成する。また、網羅的染色体局在解析・染色体コンタクト解析を中心とした研究から、コヒーシンは、姉妹染色分体間接着に加え、間期染色体のグローバルな高次構造形成も制御し、転写制御を介して分化・発生にも関与することが次々とわかりつつあった [2]。細胞機能が次々と明らかとなっていた一方で、どのようにトポロジカルに DNA と相互作用するのか、さらにこの結合様式を介して、どのように接着や染色体高次構造を形成するか、というコヒーシン分子機能の根本はほとんど理解が進んでいなかった。

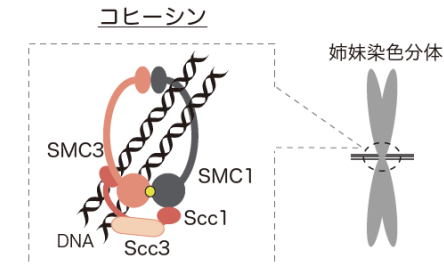


図 1. コヒーシンと姉妹染色分体間接着

2. 研究の目的

コヒーシンのタンパク質としての機能は、結晶構造解析を中心に各ドメインやサブユニットの相互作用様式について分子レベルで明らかになっていた [3]。一方で、コヒーシンがトポロジカルに DNA と相互作用する分子機構については、明らかにすべき課題が多く残されていた。研究代表者らは、分裂酵母の精製したコヒーシンを使った試験管内再構成によって、その機能的な DNA 結合反応を直接解析できる実験系を構築した [4, 5]。本研究では、この再構成系を用いて、コヒーシンが DNA に結合する分子機構、及びコヒーシンが姉妹 DNA を接着する分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

精製した分裂酵母のコヒーシンを用い、試験管内再構成実験を中心に解析を行った。コヒーシンが DNA に結合する分子機構：高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いて、コヒーシン分子の動態を可視化し、DNA に結合する過程を可視化する計画を立てた。まず、マイカステージ上に乗せたコヒーシンの動態をリアルタイムで追跡した。また、リン脂質膜上に DNA を固定化し、DNA に結合したコヒーシンの観察を行った。コヒーシンが姉妹 DNA を接着する分子機構：接着形成について予想される最もシンプルな活性は、2本の DNA 鎖を繋ぎ止める活性である。2種類の長さの異なる環状 DNA を基質に用い、コヒーシンが2本の DNA 分子を繋ぎ止める (接着する) 活性を有するかについて検証した。酵母を用いた分子生物学的解析を行い、試験管内再構成解析で得られた知見について細胞レベルで検証した。

4. 研究成果

(1) 高速 AFM によるコヒーシン分子の可視化と動的な構造変化

研究代表者らのこれまでの解析から、ローダーはコヒーシンのリング円周上の複数の箇所を渡って相互作用することが示唆されていた。このことは、コヒーシンリングは折り畳まれるような大規模な構造変化を起こし、DNA とトポロジカルに結合することを予想させた。この仮説の検証のため、高速 AFM を用いてコヒーシン分子をリアルタイムで可視化し、分子構造について解析した。コヒーシン複合体の中核は Smc1 と Smc3 である (図 1)。Smc サブユニットは2つの球状ドメイン (ヘッドとヒンジ) が約 50 nm のコイルドコイルで繋がれた特徴的な構造をとる。Smc1 と Smc3 はヒンジで結合してヘテロ 2 量体化する。ヘッドは ATPase ドメインで、ATP 結合により会合する。ヘッド部には Scc1 が結合し、コヒーシンは閉じたリングとなる。高速 AFM で観察している間、コヒーシンは Smc のコイルドコイル部がフレキシブルに動いて中央付近で折れ曲がり、リングが折りたたまれるような構造変化を繰り返した。また、環状 DNA にコヒーシンを結合させた後、高速 AFM で観察を行ったところ、コヒーシンが DNA 上を一次的に移動する様子が捕らえられた。しかし、DNA 上でのコヒーシン自体の構造やその変化については明確に判別できなかった。今後は、トポロジカルな DNA 結合に必要なローダーや ATP を段階的に加え、今回捕らえたコヒーシンの構造変化に対する影響を詳細に調べる。また、基質に用いる DNA を小型し、コヒーシンの動きを制限して DNA との相互作用時に起こす構造変化を解析することが課題である。

(2) コヒーシンの新規の DNA 結合活性の発見と姉妹染色分体間接着形成との関連

① コヒーシンはトポロジカルな結合を介して、2本のDNA分子を繋ぎ止める。コヒーシンはどのように接着を形成するのか。最もシンプルな仮説は、すでにDNAに結合しているコヒーシスが2本目のDNAを(もう片方の姉妹DNAを)繋ぎ止めることである。そこで、すでにdsDNA(二重鎖DNA)に結合しているコヒーシスを用意し、“二つめ”のdsDNA基質を加えて反応させた。様々な条件で反応を行ったが、二つめのDNA基質との結合は検出されなかった。意外なことに、単鎖DNA(ssDNA)とdsDNAを基質に反応を行ったところ、コヒーシスはこれら2種のDNA基質と同時に結合し、両者を繋ぎ止めた。一方、ssDNA同士では、dsDNA同士と同様にコヒーシスによる繋ぎ止めは起こらなかった。この二つめのssDNAとの結合は、ATPとローダーが必要であった。また、Sec1サブユニットにTEVプロテアーゼ切断部位を導入した改変コヒーシスを用いて同様の実験を行ったところ、ssDNA-dsDNAの繋ぎ止めはTEVプロテアーゼでリング構造を1箇所切断することによって解除された。これらの結果は、二つめのssDNAとの結合は、コヒーシスが一つめのdsDNAと結合する場合と同じ反応でトポロジカルな結合を介することを示唆する。

② ssDNAとコヒーシスの結合は不安定である。何故二つめのDNAが単鎖であるのかを理解する為、コヒーシスとDNAとの結合について詳細に解析した。コヒーシスはATP依存的にトポロジカルなDNA結合を行うが、ATP非依存的に非特異的にDNAと結合する。コヒーシスは、まず非特異的なDNA結合により最初にDNAとコンタクトした後、ATP依存的にトポロジカルなDNA結合を行うと考えられる。ゲルシフト法により、コヒーシスとDNAとの非特異的な結合を調べたが、ssDNAとdsDNAの間で大きな違いは検出されなかった。次に、トポロジカルなDNA結合反応を行った後に、それぞれのDNAとの結合安定性を調べた。コヒーシスとdsDNAの結合は安定で、EDTA処理(ATP加水分解に必要なMg²⁺をキレート)や高塩濃度処理に対しても結合を維持する。dsDNAとは対照的に、ssDNAはEDTA処理や高塩濃度処理でコヒーシスから解離した。このことはssDNAとコヒーシスの結合はdsDNAの場合より不安定であることを示唆する。

コヒーシスのssDNAとdsDNAに対する非特異的な結合はほぼ同程度であったことから、既にdsDNAに結合しているコヒーシスはssDNAに対して親和性が高いことが予想された。そこで二つめのDNAとしてssDNAとdsDNAを同時に加える競合実験を行った。この場合、ssDNAよりも高濃度でdsDNAを加えても、ssDNAの方が選択的に結合したことから仮説が支持された。二つめとしてssDNAが選択的になる機構については今後さらなる解析が必要である。

③ DNA複製によりssDNAをdsDNAに変換すると安定したdsDNA-dsDNAの繋ぎ止めが形成される。コヒーシスとssDNAの結合は不安定であったことから、二つめのssDNAとの結合も崩壊しやすいことが予想された。二つめのssDNA結合を行ったのちに、EDTA処理、もしくはATP枯渇処理を行うと、ssDNAとdsDNAの繋ぎ止めは速やかに崩壊した。対照的に、ATP再生系を添加すると、二つめのssDNAとの結合はより長時間保たれた。このことは、二つめのssDNAを維持するためには、コヒーシスのATP結合が重要であることを示唆する。

細胞内では、姉妹染色分体間接着は非常に安定である。例えば、接着は哺乳類の卵母細胞では数~数十年単位で保持される。一方で、試験管内再構成で形成されたssDNA-dsDNAが不安定であることは、生体内での接着の特性と対照的であった。これまでの研究から精製したコヒーシスはdsDNAとは安定に結合を維持することはわかっていた。そこで、二つめのssDNAがdsDNAに変換されれば、安定した繋ぎ止めを形成できると考えられた。実際に、二つめのssDNAをDNAポリメラーゼによってdsDNAに変換するとEDTA処理に耐性となった。以上から、コヒーシスはDNA合成を介して、安定したdsDNA-dsDNAの繋ぎ止めを形成することが判明した。

④ ssDNA結合タンパク質複合体RPAは、コヒーシスの二つめのssDNA結合を阻害する。生体内では、ssDNA領域はDNA複製や修復反応に伴い形成されるが、RPAが速やかに結合して保護された状態にある。そこでRPAを精製し、コヒーシスの二つめのssDNA結合反応に加えたところ、濃度依存的に反応が阻害された。ssDNA結合能が減弱した変異RPAを用いて同様の実験を行ったところ、この阻害は軽減された。このことは、RPAはssDNAに結合することによって、コヒーシスに二つめのssDNA結合を阻害することを示唆する。

⑤ 細胞内においてRPAは姉妹染色分体接着形成に阻害的に作用する。これまでの生化学的再構成実験から、ssDNA領域が姉妹染色分体間接着の形成に機能することが示唆された。そうであれば、RPAは接着形成に影響を及ぼすと考えられた。つまり、RPAのssDNA結合力を弱めれば、接着を形成させやすくなり、逆にRPAが増加すれば接着形成は阻害される。この仮説を検証するため、出芽酵母を用いて前述のRPA変異株とRPA過剰発現株を作製した。この株と接着形成に異常を持つ*ctf18*欠損株を掛け合わせ二重変異株を作製し、染色体上のGFPマーカーをトラックすることで接着形成能を評価した。*ctf18*欠損株にRPA変異を導入すると、接着形成の異常が部分的に改善された。また、セントロメア領域での接着形成に異常がある*chl4*欠損株においてもこのRPA変異によって部分的な抑圧が見られた。反対に、RPAの過剰発現は、それだけで接着形成に異常を起こし、*ctf18*欠損株ではさらに異常が亢進した。これらの結果は、ssDNAは接着形成に必要な生理的な基質であるという仮説と矛盾しない。

姉妹染色分体間接着は、DNA 複製に共役して形成されることが知られていたが、その分子機構は未だ不明である。本研究で得られた知見から、次のような接着形成モデルを提唱する(図2)。DNA 複製フォークでは、dsDNA がヘリカーゼによって解離し、ssDNA が露出する。リーディング鎖では連続して DNA 合成が起こるため、ssDNA 領域は速やかに dsDNA に変換される。一方、ラギング鎖では DNA 合成は不連続で、一時的に ssDNA 領域ができる。この複製フォークの直後に見られる dsDNA と ssDNA の位置関係は、コヒーシンが二つめの ssDNA 結合反応によって姉妹 DNA を繋ぎ止めるのに適した状況であると考えられる。すなわち、コヒーシンはまずリーディング鎖の dsDNA とトポロジカルに結合し、続いてラギング鎖の ssDNA を繋ぎ止める。その後、ラギング鎖合成によって ssDNA は速やかに dsDNA に変換され、安定した姉妹 DNA の接着が形成される。

本研究では、試験管内再構成実験により、コヒーシンが ssDNA-dsDNA の繋ぎ止めを行う新規の活性を見いだした。また、酵母を使った遺伝学的解析から、ssDNA 領域が接着形成に関与することが示唆された。一方で、本研究から RPA は二つめの ssDNA 結合を阻害し、接着形成に阻害的に働くこともわかってきた。今後は、RPA の阻害効果を解消する因子の同定と、その分子機構の解明が必要である。

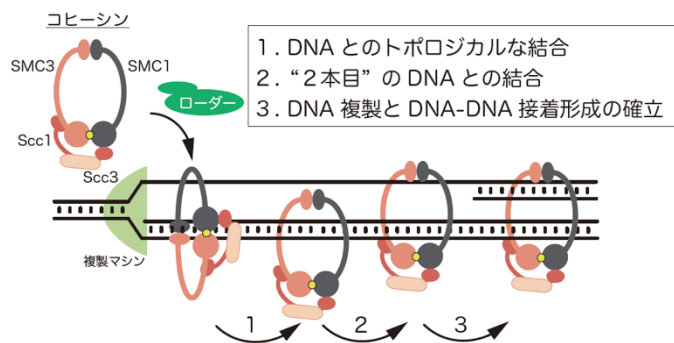


図2. 姉妹染色分体間接着形成モデル

<引用文献>

- [1] Uhlmann F. SMC complexes: from DNA to chromosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 17, 399-412 (2016).
- [2] Rada-Iglesias A, Grosveld FG, Papantonis A. Forces driving the three-dimensional folding of eukaryotic genomes. *Mol Syst Biol.*, 14, e8214 (2018).
- [3] Gligoris T and Lowe J. Structural Insights into Ring Formation of Cohesin and Related SMC Complexes. *Trends Cell Biol.*, 26, 680-693 (2016).
- [4] Murayama Y and Uhlmann F. Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature*, 505, 367-371 (2014)
- [5] Murayama Y and Uhlmann F. DNA entry into and Exit out of the cohesin ring by an Interlocking Gate Mechanism. *Cell*, 163, 1628-1640 (2015).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- (1) Yasuto Murayama. DNA entry, exit and second DNA capture by cohesin: insights from biochemical experiments. *Nucleus*, 9, 492-502 (2018). DOI:10.1080/19491034.2018.1516486.
- (2) Yasuto Murayama, Catarina P. Samora, Yumiko Kurokawa, Hiroshi Iwasaki, Frank Uhlmann. Establishment of DNA-DNA Interactions by the Cohesin Ring. *Cell*, 172, 465-477 (2018). DOI : 10.1016/j.cell.2017.12.021.
- (3) Kentaro Ito, Yasuto Murayama, Masayuki Takahashi, Hiroshi Iwasaki. Two three-strand intermediates are processed during Rad51-driven DNA strand exchange. *Nature structural and molecular biology*, 25, 29-36 (2018). 10.1038/s41594-017-0002-8.
- (4) Bilge Argunhan, Yasuto Murayama et al. Fundamental cell cycle kinase collaborate to ensure timely destruction of the synaptonemal complex during meiosis. *EMBO Journal*, 36, 2488-2509 (2017). DOI : 10.15252/embj.201695895.
- (5) Minji Jo, Yasuto Murayama, Yasuhiro Tsutsui, Hiroshi Iwasaki. In vitro site-specific recombination mediated by the tyrosine recombinase XerA of *Thermoplasma acidophilum*. *Genes to Cells*, 22, 646-661 (2017). DOI : 10.1111/gtc.12503.
- (6) Bilge Argunhan, Yasuto Murayama, Hiroshi Iwasaki. The differentiated and conserved roles of Swi5-Sfr1 in homologous recombination. *FEBS Letters*, 591, 2035-2047 (2017). DOI : 10.1002/1873-3468.12656.

- (7) William C. H. Chao, Yasuto Murayama et al. Structure of the cohesin loader Scc2. Nature Communications, 8, 13952 (2017). DOI: 10.1038/ncomms13952.

[学会発表] (計 10 件)

- (1) Yasuto Murayama. DNA binding ability of the Mis4 loader stimulates topological DNA entrapment by the cohesin ring (selected oral presentation). 3R &3C Symposium (2018).
- (2) 村山泰斗. 姉妹染色体接着はどのように形成されるか? (招待講演). 2017年度 生命科学系学会合同年次大会 (2017).
- (3) 村山泰斗. 試験管内再構成から予想される姉妹染色体接着の形成メカニズム (招待講演). 平成29年度 若手放射線生物学会 (2017).
- (4) Yasuto Murayama. Cohesin mediates DNA-DNA tethering in vitro (invited). The 2nd meeting on SMC proteins. Chromosome organizers from bacteria to human (2017).
- (5) Yasuto Murayama. The same elementary reaction can drive both DNA entry into and exit out of the chromosomal cohesin ring (selected oral presentation). The 10th 3R Symposium (2016).

[図書] (計 1 件)

村山泰斗. 染色体の新常識 第3章1項 コヒーシンによる染色体高次構造形成の分子機構. 実験医学 vol. 36, No. 17 (2018).

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.nig.ac.jp/nig/ja/research/organization-top/laboratories/murayama>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：古寺哲幸

ローマ字氏名：(KODERA, Noriyuki)